



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : A61K 31/05, 31/70	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/56737 (43) Date de publication internationale: 11 novembre 1999 (11.11.99)
--	----	--

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/01063

(22) Date de dépôt international: 5 mai 1999 (05.05.99)

(30) Données relatives à la priorité:  
98/05673 5 mai 1998 (05.05.98) FR

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cedex 13 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): SAVOURET, Jean-François [FR/FR]; 4, avenue Hoche, F-94240 L'Hay-les-Roses (FR). CASPER, Robert-Frédéric [FR/FR]; 114, rue Saint-Dominique, F-75007 Paris (FR). MILGROM, Edwin [FR/FR]; 14, boulevard Colbert, F-92330 Sceaux (FR).

(74) Mandataires: PEAUCELLE, Chantal etc.; Cabinet Armengaud Aîné, 3, avenue Bugeaud, F-75116 Paris (FR).

(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée

*Avec rapport de recherche internationale.**Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.*

(54) Title: ARYLHYDROCARBON RECEPTOR LIGAND ANTAGONISTS

(54) Titre: ANTAGONISTES DES LIGANDS DU RECEPTEUR DES ARYLHYDROCARBURES

(57) Abstract

The invention concerns arylhydrocarbon receptor ligand antagonists, characterised in that they are prepared from polyhydroxyl stilbenes, monomers or polymers or the corresponding glycosides, said compounds being in racemic form, or in the form of geometric isomers. The invention is useful for preparing medicines and foods for preventing or treating affections caused by and related to exposure to arylhydrocarbon ligands.

(57) Abrégé

L'invention concerne des antagonistes de ligands du récepteur d'arylhydrocarbures. Ces antagonistes sont caractérisés en ce qu'ils sont élaborés à partir de stilbènes polyhydroxylés, monomères ou polymères ou des glycosides correspondants, ces composés étant sous forme racémique, ou d'isomères géométriques. Applications pour la fabrication de médicaments, en diététique, et de manière générale pour fabriquer des médicaments et aliments afin de prévenir ou traiter les affections provoquées et liées à l'exposition à des ligands arylhydrocarbures.

### UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

## Antagonistes des ligands du récepteur des arylhydrocarbures

5 L'invention a pour objet des antagonistes du récepteur des arylhydrocarbures polycycliques et/ou halogénés toxiques et leurs applications, notamment, pour la prévention et le traitement des intoxications et pathologies induites par ces polluants.

10 Les arylhydrocarbures polycycliques et/ou halogénés, désignés ci-après en abrégé par ligands AhR, constituent des toxiques environnementaux. Il s'agit par exemple d'hydrocarbures halogénés (HAHs), d'hydrocarbures polyaromatiques halogénés (PAHs), de biphényles  
15 polychlorés (PCBs), de polychlorodibenzodioxines (PCDD), dont la 2, 3, 7, 8-tétrachlorodibenzo (p)dioxine (TCDD), de polychloro-dibenzofuranes (PCDF), et de benzo(a)pyrène (BaP).

20 Ces ligands AhR, et en particulier la dioxine, ont récemment reçu beaucoup d'attention du fait de leur résistance à la dégradation et de leur longue demi-vie de plus de 10 ans dans le sol et de 4 à 12 ans dans le corps humain (sang et graisses).

25 Contrairement à une croyance répandue, l'exposition aux ligands AhR ne se limite pas à la proximité des sites industriels, de décharge, ou d'accidents de pollution. Toute personne sur terre est continuellement exposée aux

toxines activatrices du AhR provenant, entre autres, de la fumée de cigarette, des gaz d'échappement des moteurs à essence ou diesel, des émanations des fours industriels, de la viande cuite au barbecue, des produits  
5 laitiers et même du lait maternel (voir référence (1) ; les références bibliographiques sont données en fin de description).

Il existe maintenant suffisamment de preuves expérimentales et cliniques pour démontrer un lien entre  
10 l'exposition aux ligands AhR et de nombreuses pathologies, telles que l'athérosclérose (2), certains cancers (3), (4), (5), la dépression immunitaire (6), les allergies et certaines maladies de la peau (7).

En outre, les ligands AhR pourraient être impliqués  
15 dans l'étiologie de certaines stérilités ( (8), (9) ), et de la diminution de la résistance aux infections virales ( (10) (11) ).

Les effets biologiques des ligands AhR sont médiés par le récepteur des arylhydrocarbures (AhR), une  
20 protéine de 108 kDa, membre de la famille bHLH/PAS, qui est présente dans le cytosol des cellules de mammifères, pratiquement dans tous les tissus (pour revue: (12) ).

Le complexe ligand/AhR est ensuite transporté dans le noyau par association avec une protéine nucléaire,  
25 ARNT ou "AhR nuclear translocator". Dans le noyau, ce complexe hétéromérique régule l'expression de certains gènes en se liant à l'ADN au niveau de séquences définies, les éléments de réponse à la dioxine (DRE), ou

les éléments de réponse xénobiotiques (XRE), qui répondent à la séquence T/GNGCGTG. Ces éléments sont localisés dans les gènes sensibles comme les cytochromes P-450 CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, dénommés gènes de phase I.

5 Ces protéines, en particulier CYP1A1 et CYP1B1, sont impliquées dans le métabolisme des HAHs, PAHs et des dioxines, souvent pour conduire à des composés plus cancérigènes.

10 De plus l'induction de CYP1A1/AHH entraîne une augmentation de la production de radicaux libres oxygénés (ROS) qui provoquent la peroxydation des lipides, des lésions oxydatives de l'ADN et des tissus, et qui peuvent conduire à des phénomènes pathologiques de tératogénèse et carcinogénèse (13).

15 Les ligands AhR induisent aussi les enzymes dits de phase II (glutathion-S-transférase, aldéhyde-3-déhydrogénase, NAD(P)H quinone réductase), qui sont responsables de la détoxification et de l'excrétion des molécules xénobiotiques. Cette induction semble avoir  
20 lieu par un mécanisme indirect mettant en jeu des éléments de réponse aux anti-oxydants dans les gènes concernés.

25 Ainsi les ligands AhR induisent une réponse transcriptionnelle complexe qui peut simultanément provoquer des effets pathologiques et concourir à l'élimination des toxiques.

Les inventeurs ont entrepris d'identifier de nouveaux ligands du récepteur AhR. Pour ce faire, ils ont transfecté de façon stable une lignée de cellules de cancer du sein, T-47D, avec un gène rapporteur (la trans-acétylase du chloramphénicol, ou CAT) placé sous le  
5 contrôle d'un élément de réponse à la dioxine ou DRE. La lignée T-47D est connue pour contenir un taux élevé de récepteur AhR (170 femtomoles/mg protéines).

Une cinquantaine de molécules ont été sélectionnées sur la base de similitude structurale globale ou  
10 partielle avec la dioxine. Ces travaux ont montré la capacité de certains composés polyhydroxylés aromatiques à bloquer de manière spécifique la liaison des ligands AhR au récepteur AhR et l'induction consécutive des  
15 enzymes de phase I par lesquels les AhR exercent leurs effets nocifs.

La plupart des composés ne se sont révélés ni agonistes, ni antagonistes de la dioxine. Ceux présentant une activité agoniste, exepté la quercétine, étaient en  
20 revanche dépourvus d'activité antagoniste.

On mesurera donc l'intérêt des propriétés spécifiquement antagonistes des composés polyhydroxylés évoqués ci-dessus.

Mettant à profit le mécanisme de compétition pour  
25 la liaison au récepteur AhR entre ces composés et les ligands AhR, l'invention a pour but de fournir des antagonistes de ce récepteur.

Elle vise également les applications de ces composés polyhydroxylés, chez l'homme et l'animal, notamment dans les domaines thérapeutiques, alimentaires et, de manière générale, pour prévenir ou traiter les affections dues aux effets toxiques résultant d'une exposition aux ligands AhR.

Les antagonistes des ligands du récepteur des arylhydrocarbures selon l'invention sont caractérisés en ce qu'ils sont élaborés à partir de stilbènes polyhydroxylés, monomères ou polymères, ou de leurs glycosides, ces composés étant sous forme racémique, ou d'isomères géométriques.

L'étude de ces composés par les inventeurs a en effet montré qu'ils sont capables d'inhiber les effets transcriptionnels des ligands AhR par un mécanisme de compétition pour la liaison au récepteur AhR.

On dispose ainsi de produits à effet anti-dioxine qui constituent donc des agents anti-pollution.

Dans un mode préféré de réalisation de l'invention, lesdits stilbènes sont trihydroxylés, et en particulier sont constitués par les 3, 5, 4' - trihydroxystilbènes ou resvératrols, et notamment par le trans-resvératrol.

Dans un autre mode de réalisation de l'invention, lesdits stilbènes sont tétrahydroxylés. Des composés avantageux comprennent le 3, 4, 3', 5-tétrahydroxystilbène ou picéatannol et le 2, 3', 4, 5'-tétrahydroxystilbène ou oxyresvératrol.

Dans encore un autre mode de réalisation de l'invention, lesdits stilbènes sont dihydroxylés et comprennent, avantageusement, les 4, 4' - dihydroxystilbènes.

5 Les glycosides des stilbènes polyhydroxylés sont avantageusement des glucosides, des galactosides, des lactosides, des mannosides, des fructosides ou des picéosides. Le résidu sucre est sous forme monomère ou polymère.

10 Des travaux antérieurs avaient porté sur l'étude du rôle de polyphénols présents dans le vin, dont le resvératrol, dans divers processus pathologiques.

Des activités anti-cyclooxygénase, antioxydantes et anticancéreuse ont été évoquées, mais n'ont pas permis de déboucher sur l'élaboration de formes galéniques permettant la mise au point de traitements efficaces.

On mesurera alors l'originalité de l'invention basée sur la mise en évidence d'un mécanisme complètement nouveau pour ces dérivés, l'inhibition du récepteur AhR, et qui permet le développement d'applications dans de nombreux domaines, et tout spécialement dans un contexte polluant.

Ainsi, l'étude des antagonistes de l'invention a montré qu'ils sont capables d'inhiber ex vivo et in vivo l'induction de gènes par les ligands AhR et les pathologies qui lui sont liées.

En particulier, ces antagonistes sont capables de bloquer l'induction des enzymes de phase I par les

ligands et de manière générale de protéger contre des effets transcriptionnels pathologiques liés à l'exposition à ces substances nocives.

L'invention vise donc leur utilisation pour la  
5 prévention et le traitement d'affections provoquées par l'exposition à des ligands AhR.

A ce titre, l'invention vise l'utilisation des antagonistes définis ci-dessus pour la fabrication de médicaments destinés à la prévention et au traitement de  
10 pathologies induites ou favorisées (dans le sens d'une aggravation d'une maladie préexistante) par les arylhydrocarbures polycycliques et/ou halogénés dans un contexte d'exposition à ces polluants.

Ces médicaments renferment le ou lesdits  
15 antagonistes en une quantité thérapeutiquement efficace et permettant d'obtenir l'effet antagoniste recherché vis-à-vis du récepteur d'arylhydrocarbures, en association avec un véhicule ou excipient pharmaceutiquement acceptable.

20 Dans l'utilisation selon l'invention, les médicaments se présentent sous une forme pour l'administration par voie orale, nasale, parentérale, topique.

Les médicaments ainsi élaborés se présentent sous  
25 des formes appropriées pour l'administration par voie orale, telles que gouttes, gélules, sirop, sirop alcoolique, par voie nasale, telle que spray ou gouttes,

par voie parentérale, sous forme de solution dans un solvant approprié, ou encore par voie topique, telle que crème, pommade, shampooing ou lotion. Les véhicules ou excipients pharmaceutiquement acceptables utilisés sont à base d'huiles admises à la pharmacopée, ou d'un alcool comme l'éthanol (de 10 % à 100 %) ou de DMSO. De manière générale, il s'agit de solvants organiques non aqueux. On peut également avoir recours à une préparation lipidique telle que Intralipid<sup>R</sup>.

On notera que lesdits stilbènes antagonistes sont solubles dans les excipients et/ou véhicules utilisés pour l'élaboration des médicaments.

La posologie dans les différentes formes et pour l'application quotidienne, sera établie, de manière classique, selon le type d'effets à traiter.

A titre d'exemple, on administrera lesdits médicaments à base desdits antagonistes à raison de 0,1 mg à 5 g/jour, notamment de 20 mg à 200 mg/jour, en particulier de 10 à 100 mg/jour.

D'une manière avantageuse, les stilbènes polyhydroxylés utilisés, selon l'invention, comme antagonistes, présentent une grande innocuité et ne donnent pas lieu à des effets secondaires nocifs.

Les médicaments élaborés à partir de ces antagonistes sont utilisables dans diverses pathologies impliquant des ligands AhR, comme l'athérogénèse, l'immunosuppression, le cancer, les infections virales telles que le SIDA, les allergies et maladies

dermatologiques associées à la dioxine et aux ligands AhR ainsi qu'à l'ostéoporose.

Divers travaux ont montré le rôle joué par les ligands AhR dans ces pathologies.

5       Ainsi, il a été démontré que, dans le système cardiovasculaire, les ligands AhR peuvent présenter des propriétés athérogènes par la perturbation des fonctions des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. Les ligands AhR induisent CYP1A1/AHH dans les cellules  
10       endothéliales de porc avec une  $DE_{50}$  (dose induisant 50% du phénomène) de 180 nM pour le BaP et 0.015 nM pour la TCDD (17). La stimulation de ces enzymes de phase I provoque une augmentation de la production de ROS (13) capable de provoquer des lésions membranaires dans les  
15       cellules endothéliales et la peroxydation des lipides. Les LDL oxydées formées par ce mécanisme font l'objet d'une endocytose non régulée par un récepteur membranaire dédié qui conduit à une hyperaccumulation dans les  
20       cellules endothéliales et à la formation de cellules d'aspect "mousse" (18).

      Outre les ligands AhR, l'acide arachidonique et les eicosanoides vasoactifs sont aussi des substrats pour CYP1A1/AHH. Il a été proposé que c'est entre autres par la perturbation du métabolisme de l'acide arachidonique  
25       que les ligands AhR pourraient être athérogènes (19). Dans (2), les auteurs ont aussi montré que les ligands AhR peuvent léser les cellules endothéliales et modifier

leur perméabilité, ce qui pourrait conduire à une incorporation accrue de déchets des cholestérol-lipoprotéines dans la paroi artérielle conduisant à la formation d'athérome. Dans le cas des PCBs, cet effet n'est observé qu'avec les congénères qui lient AhR et induisent CYP1A1. De plus, ces mêmes PCBs augmentent le stress oxydatif et la peroxydation des lipides dans les cellules endothéliales en culture, phénomène qui a été corrélé dans le temps avec l'induction de CYP1A1 et qui pourrait être le mécanisme des lésions cellulaires.

On a également rapporté que les ligands AhR, comme la dioxine, sont de puissants immunosuppresseurs (6) et sont tumorigènes chez les rongeurs. A la suite de l'immunosuppression par les ligands AhR, on observe une diminution de la résistance aux agents infectieux (11). Les ligands AhR peuvent induire l'immunosuppression par de nombreux mécanismes: (20) à (28).

Le rôle des ligands AhR dans l'immunosuppression est soutenu par la présence du récepteur AhR, de ARNT ainsi que du gène inductible CYP1A1/AHH dans les lymphocytes (23).

Les ligands AhR sont également connus pour stimuler la réplication des virus (29). Il est généralement admis que l'activation des virus VIH-1 latents par les ligands AhR est un phénomène important dans la progression du syndrome humain d'immunodéficience acquise (SIDA) (29) et (10). Les ligands AhR activent l'expression du VIH-1 par l'induction de CYP 1A1 ainsi que par l'activation du

facteur NF-kappa B (29) et (10). Les gènes de ces deux protéines contiennent des sites DRE médiant l'activation du gène par le récepteur AhR, de même que le promoteur présent dans le LTR (long terminal repeat) du virus VIH.

5 De plus, les deux voies de pénétration du VIH dans les lymphocytes, les protéines membranaires CXCR4 et CD4 contiennent aussi des DRE dans les promoteurs de leurs gènes (voir tableau 2 dans les exemples).

Les ligands AhR sont également responsables  
10 d'allergies et de maladies dermatologiques. Les hydrocarbures et la dioxine présents dans la fumée d'échappement de moteur diesel augmentent la production d'IgE par les lymphocytes B (30), ce qui contribue au développement d'affections allergiques de la peau et des  
15 voies respiratoires. De plus, le gène de l'immunoglobuline E contient un DRE (tableau 2). La surproduction d'IgE est un trait caractéristique des phénomènes d'allergie.

Les ligands AhR sont de puissants inducteurs de la  
20 chloracné. Dans tous les accidents industriels où ces composés ont été impliqués, (RFA, 1953; USA, 1964; Japon, 1968; Italie, 1976; Chine, 1977-79), la chloracné fut considérée comme le symptôme spécifique majeur de l'intoxication (7) et fut observée chez la majorité des  
25 personnes exposées. Cette éruption acnéiforme s'observe à la suite d'une altération des processus de différenciation des cellules basales des glandes sébacées

et des kératinocytes (31). Ces cellules expriment des taux croissants du récepteur AhR durant leur différenciation (32). De plus, les ligands AhR eux-même augmentent la différenciation terminale des kératinocytes (31). Les ligands Ahr doivent alors induire des modifications cutanées spécifiques en activant le récepteur AhR, ce qui conduit à la modification de l'expression des gènes sensibles dans la peau.

Enfin, de nombreuses données épidémiologiques montrent que le tabagisme est un facteur de risque de l'ostéoporose chez l'homme comme chez la femme et (33). Ceci est confirmé par la relation proportionnelle quantitative qui existe entre le tabagisme et la diminution de la densité osseuse (34), 35 et (36) et par la corrélation entre tabagisme et risques de fractures (34), (37). Les ligands AhR présents dans le tabac pourraient exercer un effet négatif sur l'os de trois manières: 1) effet anti-estrogénique direct (voir (38) pour revue); 2) effet toxique direct sur l'os puisque le tissu osseux contient des récepteurs AhR (39) ; 3) effet toxique direct sur la fonction ovarienne: Les femmes qui fument font une ménopause plus précoce de 1 à 4 ans que celle ne fumant pas. Des expériences sur animaux démontrent un effect toxique direct du benzo(a)pyrène et des autres ligands AhR sur les oocytes.

De plus, la présence constante de sites DRE dans les gènes impliqués dans l'inflammation tels que IgE, cytokines, chemokines, leurs récepteurs ainsi que la NO

synthase inductible, suggère un rôle du récepteur AhR et de ses ligands dans les pathologies inflammatoires provoquées par une production excessive d'IgE et/ou d'oxyde nitreux NO par les cellules mononucléaires infiltrées dans les tissus à la suite de la sécrétion de chemokines chimio-attractives par ces tissus. On peut citer par exemple les dermatites atopiques, l'arthrite rhumatoïde, les maladies neurodégénératives (sclérose en plaque, sclérose amyotrophique), diabète, et avortements à répétition.

La présence de DRE dans les gènes des chemokines et/ou de leurs récepteurs renforce le lien entre ligands AhR, inflammation et états fébriles. La fièvre est provoquée par l'interaction de pyrogènes bactériens ou viraux avec les cellules immunocompétentes conduisant à la sécrétion d'une cascade de cytokines. Les cytokines dont l'association avec les états fébriles a été démontrée sont le TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8 et le Macrophage Inflammatory Peptide (MIP-1). En outre, la fièvre périodique de la malaria semble être médiée par la sécrétion de TNF et de MIP-1 sous le contrôle de l'hémozoïne. Le tableau 4 montre que les gènes codant pour les récepteurs de IL-1, IL-8 et RANTES/MIP-1 contiennent tous des DRE dans leur régions promotrices. Les préparations pharmaceutiques de l'invention pourraient alors jouer un rôle modérateur au cours des

fièvres induites par l'interaction de ces cytokines avec leurs récepteurs.

En dernier lieu, la présence de sites DRE dans la séquence codante de la protéine PrP (ou prion de la  
5 maladie de Creutzfeld-Jacob) chez l'humain comme chez les bovins et dans le promoteur du gène de la préséniline (maladie d'Alzheimer) suggère que les ligands AhR puissent induire ou aggraver ces maladies neurodégénératives. En contrepartie, ces maladies  
10 pourraient être améliorées par administration de médicaments selon l'invention.

L'invention vise donc l'utilisation desdits antagonistes pour la fabrication de médicaments anti-viraux pour prévenir ou réduire les troubles associés aux  
15 infections virales induites ou favorisées par les ligands AhR, comme le rhume ou la grippe, ou pour traiter les polyposes nasales, pour traiter l'activation des infections virales latentes par les ligands AhR, telle que le SIDA induit par VIH.

20 L'invention vise également leur utilisation pour la prévention de l'encéphalite spongiforme causée par la protéine PrP (prion) chez l'humain et les bovins.

L'invention vise encore leur utilisation pour la prévention de l'ostéoporose chez la femme à tous les âges  
25 de la vie et en particulier en post-ménopause et chez la femme âgée.

Elle vise en outre leur utilisation pour le traitement des états inflammatoires causés par la

production excessive d'oxyde nitreux et/ou d'IgE, notamment de dermatites atopiques, arthrite rhumatoïde, ostéo-arthrite, les maladies neurodégénératives (sclérose en plaques, sclérose amyotrophique) et diabète.

5 L'invention est également appropriée pour la fabrication de médicaments pour le traitement de dermatites, acné, lésions d'hyperkératose, eczéma, ainsi que pour le vieillissement de la peau et les rides.

10 L'utilisation desdits antagonistes pour la fabrication de médicaments anti-viraux pour réduire les états fébriles associés aux maladies infectieuses, virales et parasitaires entre également dans le champ de l'invention.

15 De même l'invention concerne l'utilisation de ces antagonistes pour la fabrication de médicaments pour le traitement des pathologies gynécologiques et endocriniennes telles que l'endométriose, les fibromes (léiomyomes), la pré-éclampsie et les avortements à répétition.

20 L'invention a également pour objet l'utilisation desdits antagonistes pour la fabrication de médicaments pour la prévention et le traitement de la maladie d'Alzheimer.

25 Les effets inhibiteurs desdits stilbènes vis-à-vis des ligands AhR sont également avantageusement mis à profit en diététique.

L'invention vise également l'utilisation des antagonistes définis ci-dessus comme additifs alimentaires.

Elle vise ainsi des aliments caractérisés en ce qu'ils renferment au moins un antagoniste tel que défini ci-dessus en une quantité lui permettant d'exercer un effet inhibiteur vis-à-vis de ligands AhR, de manière à prévenir leurs effets nocifs. Ces aliments sont destinés à l'adulte ou à l'enfant.

Ces additifs sont incorporés dans l'alimentation, par exemple dans le lait en poudre, les préparations liquides ou solides (céréales) ou les aliments en conserve.

L'incorporation peut être réalisée durant l'élaboration des aliments ou lors de leur conditionnement, ou en utilisant des préparations avec les antagonistes déjà formulées, permettant d'effectuer la supplémentation désirée.

Les antagonistes utilisés selon l'invention sont particulièrement appropriés pour une supplémentation diététique de l'alimentation des enfants en bas âge nouveaux nés, nourrissons et très jeunes enfants dans un contexte d'exposition aux polluants aryhydrocarbures polycycliques et /ou halogénés.

La dose utilisée sera réduite par rapport à celle retenue pour un adulte, en tenant compte du poids de l'enfant et de son alimentation, de manière à obtenir une

concentration plasmatique efficace (de l'ordre du micromolaire).

Les antagonistes de l'invention présentent également un grand intérêt pour lutter contre les effets du tabagisme, qui correspond à une exposition chronique aux ligands AhR.

Les ligands AhR sont présents dans la fumée de cigarette, en particulier des polychloro-dibenzo-p-dioxines (PCDD), dont la dioxine (TCDD), et des PAHs, dont le benzo(a)pyrène (BaP). La somme de tous ces produits est équivalente à 4,3 pg/kg de poids corporel pour 20 cigarettes par jour. Chez le grand fumeur, la charge peut aller jusqu'à 0,05 mg/kg. Tous ces composés présents dans la fumée de cigarette sont capables d'induire l'expression de CYP1A1/AHH dans les poumons (4), le placenta, les reins (41), les ovaires et les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. L'induction de CYP1A1/AHH et des autres enzymes de la phase I conduit à la production de ROS qui provoquent des lésions oxydatives sur l'ADN (43). La métabolisation des hydrocarbures polyaromatiques par CYP1A1/AHH résulte en outre en la production d'intermédiaires carcinogènes très réactifs (43) qui se lient à l'ADN pour former des adducts covalents.

Le tabagisme a été mis en cause directement dans l'occurrence d'au moins huit types différents de cancers humains dans le poumon, la vessie, le tractus intestinal,

et les lymphocytes (pour revue, voir (44)). Les ligands AhR ont été impliqués dans la génèse du cancer du poumon, par l'identification d'un polymorphisme génétique de CYP1A1. En outre, le tabagisme est une cause directe de l'ischémie cardiaque, la principale cause de mortalité dans le monde occidental (44). Il existe aussi des données épidémiologiques qui relient le tabagisme à l'accélération du SIDA (10) ainsi qu'à l'ostéoporose (33), (34), (35).

On met à profit les propriétés avantageuses des antagonistes de l'invention en les utilisant pour imprégner les filtres de cigarette, afin de délivrer une dose d'antagoniste proportionnelle à la concentration de toxiques absorbée avec la fumée, et conduisant à une concentration sanguine permettant de bloquer l'induction de CYP1A1 et des autres enzymes de phase I au niveau des organes en contact avec les arylhydrocarbures (voies respiratoires, poumon, rein, vessie).

Les stilbènes polyhydroxylés utilisés selon l'invention sont obtenus par extraction à partir de végétaux, notamment en ce qui concerne les glycosides, ou par voie de synthèse. Les isomères géométriques, lorsqu'ils existent sont séparés selon les techniques classiques.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention sont donnés dans les exemples qui suivent qui se rapportent, à titre illustratif, au trans-resvératrol, qui sera appelé Resvératrol.

Dans ces exemples, les figures 1 à 7 représentent :

- les figures 1A et 1B, les courbes d'induction (nombre de fois) d'un gène rapporteur placé sous le contrôle d'un élément de réponse à la dioxine, transfecté dans la lignée T-47 D, en fonction de la concentration en TCDD, en présence de TCDD seule ou de TCDD+ Resvératrol (1A), et d'inhibition de l'induction par TCDD (en %) de ce gène en fonction de la concentration en Resvératrol, (1B),

- la figure 2, l'inhibition par le Resvératrol de l'induction de CYP1A1 par TCDD dans les cellules T-47D,

- la figure 3, les courbes de compétition de liaison au récepteur AhR entre TCDD,  $\alpha$ NF, le Resvératrol, l'indole-3-carbinol, dans le cytosol de foie de lapin,

- la figure 4, l'activité estrogénique de l'oestradiol comparé à celle du Resvératrol, à différentes concentrations, sur un gène rapporteur oestrogéno-dépendant transfecté de façon transitoire dans les cellules T-47D,

- la figure 5, la régulation de l'activité NAD(P)H quinone réductase par TCDD et ses antagonistes dans les cellules T-47D,

- la figure 6, la répression de l'induction du promoteur du LTR de VIH (VIH-LTR-CAT) par TCDD dans les cellules T-47D, et

- la figure 7, l'inhibition de l'induction *in vivo* de Cyp 1A1 chez le rat par l'association benzo [a] pyrène/DMBA.

5 Inhibition de l'induction de la transcription des enzymes de phase I par les ligands AhR.

On transfecte de manière stable la lignée T-47D de cellules de cancer du sein avec un gène rapporteur, la trans-acétylase du chloramphénicol, CAT en abrégé, placé sous le contrôle d'un élément de réponse à la dioxine.

10 On rapporte sur la figure 1A, en fonction de la concentration en TCDD (-log M) (nombre de fois), l'induction de CAT en présence de TCDD seule (courbe ■) et de TCDD avec  $10^{-6}$  M de Resvératrol (courbe ▷).

15 L'examen des résultats obtenus montre l'effet inhibiteur de Resvératrol vis-à-vis de l'induction de la transcription des enzymes de phase I par TCDD.

La figure 1B donne l'inhibition par le Resvératrol de l'induction en % de CAT en fonction de la concentration en TCDD (-log M). On constate que  
20 l'inhibition observée est dose-dépendante.

Inhibition de l'induction de la protéine Cyp1A1 par la dioxine.

On mesure l'expression de la protéine CYP1A1 *in vivo* en réponse à une concentration efficace de TCDD ( $10^{-10}$  M), en présence ou en l'absence de Resvératrol.  
25

Les cellules T-47D sont cultivées dans le DMEM additionné de 10 % de sérum de veau foetal et traitées 48h par l'éthanol seul (témoin),  $10^{-10}$  M dioxine (TCDD),

10<sup>-6</sup> M Resvératrol (ResV), une combinaison de dioxine et Resvératrol (TCDD + ResV), 10<sup>-6</sup> M  $\alpha$ -naphthoflavone ( $\alpha$ -NF) ou une combinaison de dioxine et  $\alpha$ -naphthoflavone (TCDD +  $\alpha$ -NF). Les cellules sont collectées et lavées dans le  
5 PBS, puis lysées par fusion-congélation répétée en conditions isotoniques. 75  $\mu$ g de protéines sont analysées par électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes. Le gel est transféré sur une membrane de nylon. La membrane est saturée avec 5 % de lait écrémé et  
10 incubée avec un anticorps polyclonal de lapin (Daiichi Pure Chemicals Co, Japan) contre Cyp1A1. Les immuncomplexes sont détectés par chimioluminescence avec le kit Renaissance (DuPont).

La figure 2 correspond à la photo du Western blot.

15 La flèche montre la bande spécifique de Cyp1A1, les astérisques signalent des bandes non-spécifiques.

On observe que le Resvératrol à une concentration de 10<sup>-6</sup> M inhibe l'induction de la protéine CYP1A1 d'environ 60%.



20 L'effet inhibiteur du Resvératrol est légèrement inférieur à celui de l'antagoniste classique de la dioxine, l' $\alpha$ -7,8-benzoflavone (ou  $\alpha$ -naphthoflavone;  $\alpha$ NF). En revanche, ce dernier composé, à la différence du Resvératrol, présente des effets agonistes autant  
25 qu'antagonistes à la concentration de 10<sup>-5</sup>M alors que le resvératrol est un pur antagoniste.

Ces résultats confirment que le Resvératrol est capable de bloquer l'induction de gènes sensibles aux ligands AhR, tels que CYP1A1/AHH et les autres enzymes de phase I.

5

. Etude de l'activité antagoniste du Resvératrol

On a mesuré la capacité du Resvératrol de déplacer la dioxine radioactive (dioxine [2,6, di<sup>3</sup>H], 28 Ci/mmmole, Terrachem, Kansas, USA) de son récepteur en comparaison  
10 avec d'autres ligands tels que l'a-NF ou l'indole-3-carbinol. On a utilisé un cytosol de foie de lapin pour ces études de compétition, car le lapin possède un récepteur AhR dont l'affinité est identique à celle du  
15 récepteur humain, à la différence du récepteur de souris.

On rapporte sur la figure 3 le % de liaison spécifique au récepteur AhR en fonction de la concentration (M) en dioxine marquée au tritium (  ), en présence de concentrations croissantes de α-naphtoflavone (o), de Resvératrol (  ), et d'indole-3-carbinol (<sup>13</sup> C).

On observe que dans ce modèle, la dioxine et l'a-NF déplacent la dioxine marquée de son récepteur avec un Kd apparent de  $3.10^{-9}$  M. Le Resvératrol déplace aussi la  
25 dioxine, bien qu'avec une affinité plus faible ( $6.10^{-6}$  M). Le Resvératrol montre une affinité plus forte que l'autre ligand naturel, l'indole-3-carbinol. Ces résultats

démontrent que le Resvératrol exerce ses effets antagonistes par compétition pour le récepteur AhR.

. Etude d'effets de type stéroïdien

On a transfecté de façon transitoire les cellules  
5 T-47D avec différentes constructions CAT sous contrôle de  
l'élément de réponse à l'estradiol (ERE) du gène de la vitellogénine ou celui, plus faible, du gène du récepteur de la progestérone, ainsi que des éléments de réponse à la progestérone (PRE) et aux androgènes (ARE) du virus  
10 murin MMTV et d'un élément de réponse à la vitamine D (VDRE) synthétique.

La figure 4 donne l'induction de CAT pour  
l'oestradiol (E2)  $10^{-10}$  M, le Resvératrol (ResV)  $10^{-7}$  M,  
5 x  $10^{-7}$  M,  $10^{-6}$  M, 5 x  $10^{-6}$  M,  $10^{-5}$  M et 5 x  $10^{-5}$  M.

15 Le Resvératrol n'a exercé aucun effet sur les PRE, ARE ou VDRE. Le Resvératrol a présenté un faible effet estrogénique sur l'ERE du gène de la vitellogénine, équivalent à 1/500.000 ème de l'effet de l'estradiol. La courbe dose-réponse montre qu'on observe à partir de  $10^{-5}$   
20 M de Resvératrol un effet équivalent au 1/5ème de celui de  $10^{-10}$  M d'estradiol. Cette concentration d'estradiol est celle retrouvée dans le sang des humains de sexe masculin.

. Régulation de l'activité NAD(P)H quinone  
25 réductase par la dioxine et ses antagonistes dans les  
cellules T-47D.

Les cellules T-47D ont été cultivées pendant 72 h en l'absence (ctl) ou en présence de dioxine  $10^{-9}$  M (TCDD), Resvératrol  $10^{-6}$  M (Res),  $\alpha$ -naphthoflavone  $10^{-6}$  M ( $\alpha$ -NF), isolément ou selon les combinaisons indiquées. L'activité NQOR correspondante exprimée en nanomoles de cytochrome c réduit, par mg de protéines, par min, est donnée sur la figure 5.

Il est intéressant de noter que ni le Resvératrol ni l' $\alpha$ -NF ne répriment l'induction indirecte des enzymes de phase II provoquée par la dioxine ou la NAD(P)H quinone réductase. Cet effet bénéfique est ainsi conservé.

Des résultats similaires sont obtenus pour la GST-Ya.

Etude de l'inhibition par le Resvératrol de l'induction d'autres gènes par les ligands AhR.

On a recherché, dans les banques de données EMBL et GENBANK, les gènes humains contenant des DRE dans leurs régions promotrices, en utilisant les consensus T/GNGCGTG dans les deux orientations possibles. En dehors des gènes des enzymes de phase I, on a découvert une population restreinte de gènes contenant un ou plusieurs DRE et donc susceptibles d'être régulés par les ligands AhR et le Resvératrol.

Ces gènes sont présentés dans les tableaux 1, 2 et 3 en fonction de leur association à des mécanismes physiologiques ou des états pathologiques distincts.

Le tableau 1 montre les gènes impliqués dans les régulations hormonales, le métabolisme des lipides, les maladies génétiques ou dégénératives, les cancers.

Le tableau 2 montre les gènes des cytokines et de leurs récepteurs qui sont impliqués dans le chimiotactisme et l'inflammation.

Le tableau 3 montre les virus et certaines protéines cellulaires qui interagissent avec eux.

Tableau 1

GENES	Numéro d'ACCESSION	SITES (Nbre)	LOCALISATION	COMMENTAIRE
Récepteur des Glucocorticoïdes	U10430	8	promoteur	
<b>Enzymes</b>				
NOS inducible	X97821	4	promoteur	
NOS endothéliale	U24214	1	promoteur	
Cyclooxygénase 2	U20548	1	promoteur	
PG H Synthase	U44805	1	promoteur	
PG endoperoxyde synthase	M31812	1	promoteur	
5-Lipoxygénase	M38191	5	promoteur, cds	
15-lipoxygénase	U63384	1	promoteur	
Phospholipase A2	U11239	2	promoteur	
Thromboxane A2 récepteur	D15054	1	promoteur	
<b>Recepteurs</b>				
PDGF chaîne A	U40769	2	promoteur	
IGF-1 récepteur	M69229	6	promoteur	
VEGF récepteur	D64016	2	promoteur	
<b>Gènes impliqués en pathologie humaine</b>				
Protéine APC	U02509	2	promoteur, cds	polypes du colon
Protéine APC	D13981	1	exon supplémentaire	spécifique du cerveau
Protéine APC	D13980	1	5' UTR	multiple variants
Prion Humain	D00015	2	cds	
[Prion bovin]	D26150	1	intron 1	gène bovin
Ob (leptine)	U43589	2	promoteur	obésité
préséniline	L76518	1	promoteur	Alzheimer
GADD p153	S40707	2	promoteur	lésions de l'ADN
<b>Oncogènes</b>				
WT 1b	S77896	1	promoteur	Tumeurs de Wilm
WNT-5A	U39837	3	promoteur	
PCNA	J05614	1	promoteur	
p53	J04238	17	complete gene	apoptose et cycle cellulaire
p53	J04238	1	promoteur	
c-Ha-Ras	M13221	1	promoteur	
c-jun	U60581	3	promoteur	
c-myc p64	M13930	4	promoteur	
c-raf	M38134	2	promoteur	
ATF 3	U37542	2	promoteur	

Tableau 1: Gènes humains contenant des DRE dans leur séquences régulatrices. Le gène du Prion bovin est aussi mentionné. Cds: séquence codante. UTR: région non traduite.

Tableau 2

GENES	Numéro d' ACCESSION	LOCALISATION	SITES (Nbre)	COMMENTAIRE
Interleukines, Chemokines				
TNF	E01052	cds	1	
IL 7	M29048	promoteur	1	
IL 10	X73536	promoteur	1	
IL1-RA	U65590	gene (introns)	4	
RANTES	S64885	promoteur	1	
LIGHT	AF03581	cds	1	tnf-like
LIT	AF035854	cds	1	
CD40 ligand	D31793	promoteur	1	gp39 tnf-like
SCM 1 alpha	D63790	cds	2	
MDC	U83171	cds	1	
Eotaxine	U46572	cds	1	chemokine
STCP-1	U82992	cds	2	T-cell chemokine
Netrine-2 like	U86758	cds	16	
Récepteurs				
IL-1 récepteur 1	AF054830	cds	1	
IL-1 récepteur 2	X59770	cds	1	
IL-2 récepteur a	U57613	promoteur	3	
IL-2 récepteur b	X53093	promoteur	1	
IL-8 récepteur a	U11870	promoteur	3	
IL-8 récepteur b	U11866	promoteur	1	
IL 10 récepteur	U00672	cds	1	
CXCR4	AF005058	promoteur, cds	9	HIV co-récepteur
DARC	Y14873	5'UTR	3	
CCR6	U45984	cds	1	
TNF récepteur p75/80	U53483, S63368	promoteur, cds	6	
RANTES/MIP1 récepteur	L10918	cds	2	
DR3	AF026070	cds	1	tnf-like récepteur
decoy récepteur 2	AF029761	5'UTR	1	tnf-like récepteur
interferon $\gamma$ récepteur 2	U68755	promoteur	3	
VEGF récepteur	D64016	promoteur	2	
Protéines d'Adhésion				
connexine 32	L47127	5' UTR	1	
connexine43	U64573	promoteur, cds	3	
ICAM (CD54)	M65001	promoteur, cds	4	
Gènes en relation.				
Ig E	M55420	cds	2	région variable
IgE	S71428	cds	4	isoforme
CD23 p45	X06049	promoteur	1	IgE récepteur
NF-IL3	S79880	cds	1	
NF Kappa B p65	L01459	promoteur	2	
NF Kappa B p50	S57113	promoteur	1	
I kappa B alpha	U08468	promoteur	2	
RANKL	AF0190047	cds	1	

Tableau 2: Gènes associés au chimiotactisme et à l'inflammation et contenant des DRE dans leur régions régulatrices. Cds: séquence codante. UTR: région non traduite.

Tableau 3

VIRUS HUMAINS et gènes associés	Numéro d' ACCESSION	LOCALISATION	SITES (Nbre)	COMMENTAIRE
Cytomegalovirus IE-1	M64941	promoteur	1	
HTLV-1	S76263	5'LTR	1	présent dans tous les isolats
HTLV-1	S76263	gène TAX	1	
HTLV-4	X06392	5'LTR	2	
HIV 1 isolat BRU (LAV-1)	K02013	3' LTR	1	
HIV 2	U22047	génom	2	
HIV2 EHO	U27200	génom	1	HIV récepteur HIV récepteur HIV co-récepteur
CD4	U01066	promoteur	1	
CD4	S79267	cds	2	
CXCR4	AF005058	promoteur, cds	9	
Papilloma Virus (HPV)	X52061	génom lcr	1	"long control region"
HPV 11	J04351	génom	2	région 3' gène E6
HPV 16	M33616	génom	1	
HPV 25	D50264	promoteur	1	
HPV 33, 47, 58 59		génom		
Poliovirus 1	X70509	5'UTR	1	
Rhinovirus 1B	D00239	génom	2	IE transactivateur segment "a"
Rhinovirus 2, 14, 89		génom		
Herpes virus HSV1	U18080	génom	1	
Herpes virus HSV1	M13885	génom	1	
Hépatite A virus	K02990	génom	1	
Hépatite B virus	X98077	génom	1	TR droit gène E1A protéine liant les complexes HLA E1A gene
Hépatite C virus	D30613	génom	4	
Adenovirus type 2	J01917	génom	21	
Adenovirus type 12	J01910	génom	1	
Adenovirus type 12	X14757	promoteur	1	
Adenovirus type 19A	X95259	early region 3	1	protéine d'ancrage Protéines M1, M2 matrix, hémagglutinine, neuraminidase, ARN polymérase
Adenovirus type 41	M18289	génom	1	
Virus syncytial respiratoire	M17212	cds	1	
Influenza virus, tous sous-types.		génom: sites multiple dans divers gènes		

Tableau 3: Génomes viraux ou gènes contenant des DRE's. UTR: région non traduite. LTR: longue région répétée terminale. IE: gènes d'expression immédiate précoce. Cds: séquence codante. TR: séquence répétée terminale

Pour tester cette hypothèse, selon laquelle les gènes possédant des DRE dans leur promoteur seraient généralement sensibles aux ligands AhR et que cet effet pourrait être inhibé par le Resvératrol, on a choisi comme modèle représentatif le promoteur de la séquence répétée (LTR) de VIH-1, qui contient un DRE typique. On a transfecté les cellules T-47D avec une construction CAT contenant ce promoteur (-452/+77). Les cellules ont ensuite été traitées par la dioxine ( $10^{-9}$  M) ou le Resvératrol ( $10^{-6}$  M), seuls ou en association ( $p = 0,01$ ).

La dioxine a induit le promoteur de VIH par un facteur de 3 et cette induction a été totalement supprimée par le Resvératrol.

Ces résultats démontrent donc que des concentrations de Resvératrol, de l'ordre de celles utilisables en thérapeutique humaine, sont capables de bloquer l'induction des enzymes de phase I et du promoteur du VIH par les ligands AhR. De la même manière, le Resvératrol s'avère capable de protéger contre d'autres effets transcriptionnels pathologiques liés à l'exposition à ces substances nocives.

. Etude du Resvératrol en tant qu'antagoniste des ligands AhR in vivo.

Des rats Sprague-Dawley femelle ont été traités par une combinaison de Benzol [a]pyrène et de DMBA (diméthylbenzanthracène), deux ligands AhR présents dans la fumée de cigarette. Des expériences préliminaires ont montré que cyp 1A1 était induit à partir de 1 mg/kg des deux ligands administrés ensemble. Ce traitement a ensuite été répété en présence ou absence de resvératrol à doses croissantes (1 et 5 mg/kg). Les animaux ont été sacrifiés et les organes prélevés. Des extraits cellulaires totaux ont été préparés et analysés par immunoblot pour détecter l'expression de cyp 1A1 dans ces tissus.

Les résultats obtenus sont rapportés sur la figure 7 où les lignes 1 à 7 correspondent respectivement à :

Ligne 1 : 1 mg/kg BaP/DMBA

Ligne 2 : 1 mg/kg BaP/DMBA plus 1 mg/kg resvératrol

Ligne 3 : 1 mg/kg BaP/DMBA plus 5 mg/kg resvératrol

Ligne 4 : 5 mg/kg resvératrol

Ligne 5 : véhicule seul (huile d'olive)

Chaque ligne contient 30 µg (poumon) ou 60 µg (rein) de protéines.

Comme le montre la figure 7, l'association BaP/DMBA provoque l'expression de cyp 1A1 dans le poumon et le rein. Cette induction est totalement supprimée par le resvératrol, dans les conditions de concentration égale des substances, montrant que le resvératrol est plus actif *in vivo* que *ex vivo*, où un excès de 5000 fois est nécessaire pour observer l'inhibition. Cette

observation est en faveur d'une métabolisation du resvératrol en un composé plus actif dans l'animal, le resvératrol agissant ainsi comme une "pro-drogue".

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1/ Bock, K. W. (1994). Aryl hydrocarbon or dioxin  
5 receptor: biologic and toxic responses. Rev Physiol  
Biochem Pharmacol 125, 1-42.
- 2/ Toborek, M., Barger, S. W., Mattson, M. P.,  
Espandiari, P., Robertson, L. W., and Hennig, B. (1995).  
10 Exposure to polychlorinated biphenyls causes endothelial  
cell dysfunction. J Biochem Toxicol 10, 219-226.
- 3/ Kleman M, Gustafsson J-A. (1996). Interactions of  
procarcinogenic heterocyclic amines and indolocarbazoles  
15 with the dioxin receptor. Biol Chem 377:741-762.
- 4/ Bartsch, H., Petruzzelli, S., De Flora, S., Hietanen,  
E., Camus, A. M., Castegnaro, M., Alexandrov, K., Rojas,  
M., Saracci, R., and Giuntini, C. (1992). Carcinogen  
20 metabolism in human lung tissues and the effect of  
tobacco smoking: results from a case-control multicenter  
study on lung cancer patients. Environ Health Perspect  
98, 119-24.
- 25 5/ Nebert, D. W., Puga, A., and Vasilidou, V. (1993). Role  
of the Ah receptor and the dioxin-inducible [Ah] gene  
battery in toxicity, cancer, and signal transduction.

[Review] [75 refs]. Annals of the New York Academy of Sciences 685, 624-40.

6/ Kerkvliet, N. I. (1995). Immunological effects of  
5 chlorinated dibenzo-p-dioxins. Environ Health Perspect  
103 Suppl 9, 47-53.

7/ Suskind, R. R. (1985). Chloracne, "the hallmark of  
dioxin intoxication". Scand J Work Environ Health 11,  
10 165-71.

8/ Mattison DR, Plowchalk DR, Meadows MJ, Miller MM,  
Malek A, London S. The effect of smoking on oogenesis,  
fertilization and implantation. Sem Reprod Health 7:291-  
15 304, 1989

9/ Rier SE, Martin DC, Bowman RE, Dmowski WP, Becker JL.  
(1993). Endometriosis in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*)  
following chronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-  
20 p-dioxin. Fundamental & Applied Toxicology 21:433-41.

10/ Yao, Y., Hoffer, A., Chang, C. Y., and Puga, A.  
(1995). Dioxin activates HIV-1 gene expression by an  
oxidative stress pathway requiring a functional  
25 cytochrome P450 CYP1A1 enzyme. Environ Health Perspect  
103, 366-71.

11/ Burleson, G. R., Lebrec, H., Yang, Y. G., Ibanes, J. D., Pennington, K. N., and Birnbaum, L. S. (1996). Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on influenza virus host resistance in mice. Fundam Appl Toxicol 29, 40-7.

12/ Rowlands JC, Gustafsson J-A. (1997). Aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction. Crit Rev Toxicol 27:109-34.

13/ Park, J. Y., Shigenaga, M. K., and Ames, B. N. (1996). Induction of cytochrome P4501A1 by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin or indolo(3,2-b)carbazole is associated with oxidative DNA damage. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93, 2322-7.

14/ Rimm EB, Klatsky A, Grobbee D, Stampfer MJ. (1996). Review of moderate alcohol consumption and reduced risk of coronary heart disease: is the effect due to beer, wine or spirits? Br Med J 312:731-6.

15/ Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. (1997). Resveratrol: A molecule whose time has come? And gone? Clin Biochemistry 30:91-113.

16/ Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CWW, Fong HHS, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta

RG, Moon RC, Pezzuto JM. (1997) Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. Science 275:218-20.

5 17/ Stegeman JJ, Hahn ME, Weisbrod R, Woodin BR, Joy JS, Najibi S, Cohen RA. (1995) Induction of cytochrome P4501A1 by aryl hydrocarbon receptor agonists in porcine aorta endothelial cells in culture and cytochrome P4501A1 activity in intact cells. Molecular Pharmacology 47:296-  
10 306.

18/ Steinberg D, Parsatharathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. (1989). Beyond cholesterol. Modifications of the low density lipoprotein that increase its  
15 atherogenicity. N Engl J Med 320:915-24.

19/ Rifkind AB, Gannon M, Gross SS. (1990). Arachidionic acid metabolism by dioxin-induced cytochrome P-450: a new hypothesis on the rôle of P-450 in dioxin toxicity.  
20 Biochem Biophys Res Commun 172:1180-88.

20/ Blaylock, B. L., Holladay, S. D., Comment, C. E., Heindel, J. J., and Luster, M. I. (1992). Exposure to tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) alters fetal thymocyte  
25 maturation. Toxicol Appl Pharmacol 112, 207-13.

- 21/ De Heer, C., Verlaan, A. P., Penninks, A. H., Vos, J. G., Schuurman, H. J., and Van Loveren, H. (1994). Time course of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced thymic atrophy in the Wistar rat. Toxicology & Applied Pharmacology 128, 97-104.
- 22/ Yoo, B. S., Jung, K. H., Hana, S. B., and Kim, H. M. (1997). Apoptosis-mediated immunotoxicity of polychlorinated biphenyls (PCBs) in murine splenocytes. Toxicol Lett 91, 83-9.
- 23/ Masten, S. A., and Shiverick, K. T. (1996). Characterization of the aryl hydrocarbon receptor complex in human B lymphocytes: evidence for a distinct nuclear DNA-binding form. Arch Biochem Biophys 336, 297-308.
- 24/ Gehrs, B. C., Riddle, M. M., Williams, W. C., and Smialowicz, R. J. (1997). Alterations in the developing immune system of the F344 rat after perinatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: II. Effects on the pup and the adult. Toxicology 122, 229-40.
- 25/ Yang, Y. G., Lebrec, H., and Burleson, G. R. (1994). Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on pulmonary influenza virus titer and natural killer (NK) activity in rats. Fundamental & Applied Toxicology 23, 125-31.

26/ Kamath, A. B., Xu, H., Nagarkatti, P. S., and  
Nagarkatti, M. (1997). Evidence for the induction of  
apoptosis in thymocytes by 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-  
dioxin in vivo. Toxicol Appl Pharmacol 142, 367-77.

5

27/ Yin, H., Li, Y., and Sutter, T. R. (1994). Dioxin-  
enhanced expression of interleukin-1 beta in human  
epidermal keratinocytes: potential role in the modulation  
of immune and inflammatory responses. Exp Clin  
10 Immunogenet 11, 128-35.

15

28/ Fan, F., Yan, B., Wood, G., Viluksela, M., and  
Rozman, K. K. (1997). Cytokines (IL-1beta and TNFalpha)  
in relation to biochemical and immunological effects of  
2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in rats.  
Toxicology 116, 9-16.

20

29/ Gollapudi S, Kim CH, Patel A, Sindhu R, Gupta S.  
(1996). Dioxin activates human immunodeficiency virus-1  
expression in chronically infected promonocytic U1 cells  
by enhancing NF-kappaB activity and production of tumor  
necrosis factor alpha. Biochem Biophys Res Commun  
226:889-894.

25

30/ Takenaka, H., Zhang, K., Diaz-Sanchez, D., Tsien A.  
and Saxon, A. (1995) Enhanced IgE production results from  
exposure to the aromatic hydrocarbons from diesel

exhaust: direct effect on B-cell production. J. Allergy Clin. Immunol. 95, 103-115.

31/ Berkers, J. A., Hassing, I., Spenkeliink, B., Brouwer,  
5 A., and Blaauboer, B. J. (1995). Interactive effects of  
2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and retinoids on  
proliferation and differentiation in cultured human  
keratinocytes: quantification of cross-linked envelope  
formation. Arch Toxicol 69, 368-78.

10

32/ Wanner, R., Panteleyev, A., Henz, B. M., and  
Rosenbach, T. (1996). Retinoic acid affects the  
expression rate of the differentiation-related genes  
aryl hydrocarbon receptor, ARNT and keratin 4 in  
15 proliferative keratinocytes only. Biochim Biophys Acta  
1317, 105-11.

20

33/ Franceschi S, Schinella D, Bidoli E, Dal Maso L,  
LaVecchia C, Parazzini F, Zecchin R. The influence of  
body size, smoking, and diet on bone density in pre-and  
postmenopausal women. Epidemiology 7(4):411-4, 1996

25

34/ Grisso JA, Kelsey JL, O'Brien LA, Miles CG, Sidney S,  
Maislin G, LaPann K, Moritz D, Peters B. Risk factors for  
hip fracture in men. Hip fracture study group. Am J of  
Epidemiology 145(9):786-93, 1997

35/ Egger P, Duggleby S, Hobbs R, Fall C, Cooper C.  
Cigarette smoking and bone mineral density in the  
elderly. J or Epidemiology & Community Health 50(1):47-50,  
1996

5

36/ Hopper JL, Seeman E. (1994). The bone density of  
female twins discordant for tobacco use. N Engl J Med  
330:387-392.

10

37/ Johansson C, Mellstrom D, An earlier fracture as a  
risk factor for new fracture and its association with  
smoking and menopausal age in women. Maturitas 24(1-  
2):97-106, 1996.

15

38/ Safe, S., and Krishnan, V. (1995). Chlorinated  
hydrocarbons: estrogens and antiestrogens. Toxicol Lett  
82-83, 731-736.

20

39/ Abbott, B.D. (1995). Review of the interaction  
between TCDD and glucocorticoids in embryonic palate.  
Toxicology 105, 365-73.

25

40/ Gurtoo, H. L., Williams, C. J., Gottlieb, K.,  
Mulhern, A. I., Caballes, L., Vaught, J. B., Marinello,  
A. J., and Bansal, S. K. (1983). Population distribution  
of placental benzo(a)pyrene metabolism in smokers. Int J  
Cancer 31, 29-37.

41/ Bilimoria, M. H., and Ecobichon, D. J. (1980).  
Responses of rodent hepatic, renal and pulmonary aryl  
hydrocarbon hydroxylase following exposure to cigarette  
5 smoke. Toxicology 15, 83-9.

42/ Mattison DR, Thorgeirsson SS. Smoking and industrial  
pollution and their effects on menopause and ovarian  
cancer. Lancet 1:187-88, 1978

10 43/ Kiyohara, C., Hirohata, T., and Inutsuka, S. (1996).  
The relationship between aryl hydrocarbon hydroxylase and  
polymorphisms of the CYP1A1 gene. Japanese Journal of  
Cancer Research 87, 18-24.

15 44/ Boyle P. (1997). Cancer, cigarette smoking and  
premature death in Europe: a review including the  
recommendations of European cancer experts consensus  
meeting, Helsinki, October 1996. Lung Cancer 17:1-60.

20

## REVENDICATIONS

1/ Antagonistes de ligands du récepteur  
5 d'arylhydrocarbures, caractérisés en ce qu'ils sont  
élaborés à partir de stilbènes polyhydroxylés, monomères  
ou polymères ou des glycosides correspondants, ces  
composés étant sous forme racémique, ou d'isomères  
géométriques.

10 2/ Antagonistes selon la revendications 1,  
caractérisés en ce que lesdits stilbènes sont  
trihydroxylés, et en particulier sont constitués par les  
3, 5, 4'-trihydroxystilbène cis et trans ou resvératrols,  
et notamment par le trans resvératrol.

15 3/ Antagonistes selon la revendication 1,  
caractérisés en ce que lesdits stilbènes sont  
tétrahydroxylés et en particulier comprennent les 3, 4,  
3', 5-tétrahydroxystilbènes ou picéatannols, et les 2,  
3', 4, 5'-tétrahydroxystilbènes ou oxyresvératrols.

20 4/ Antagonistes selon la revendication 1,  
caractérisés en ce que lesdits stilbènes sont  
dihydroxylés et comprennent les 4, 4'-dihydroxystilbènes.

5/ Antagonistes selon l'une quelconque des  
revendications précédentes, caractérisés en ce que  
25 lesdits glycosides sont des glucosides, des galactosides,  
des mannosides.

6/ Utilisation des antagonistes selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, pour la prévention ou le traitement d'affections provoquées par l'exposition à des ligands arylhydrocarbures.

5 7/ Utilisation des antagonistes selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, pour la fabrication de médicaments destinés à la prévention et au traitement de pathologies induites ou favorisées par les arylhydrocarbures polycycliques et/ou halogénés dans un  
10 contexte d'exposition à ces polluants.

8/ Utilisation selon la revendication 7, caractérisée en ce que lesdits médicaments se présentent sous une forme pour l'administration par voie orale, nasale, parentérale ou topique.

15 9/ Utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que lesdits médicaments se présentent sous forme de gélule, gouttes, sirop, sirop alcoolique, pour une administration par voie orale, de spray ou gouttes, pour une administration par voie nasale, de  
20 solution pour une administration par voie parentérale et de crème, pommade, ou shampooing ou de lotion pour une application par voie topique, le véhicule comprenant une huile ou un alcool pharmaceutiquement acceptable.

25 10/ Utilisation selon l'une quelconque des revendications 7 à 9, caractérisée en ce que lesdits médicaments sont administrés à raison de 0,1 mg à 5 g/jour, notamment de 20 à 200 mg/jour, et en particulier de 10 à 100 mg/jour.

11/ Utilisation selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, pour la fabrication de médicaments anti-viraux, pour prévenir les troubles associés aux infections virales induites ou favorisées par les ligands AhR, comme le rhume ou la grippe, ou pour traiter les polyposes nasales, pour traiter l'activation des infections virales latentes par les ligands AhR, telle que le SIDA induit par VIH.

12/ Utilisation selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, pour la prévention de l'encéphalite spongiforme causée par la protéine PrP (prion) chez l'humain et les bovins.

13/ Utilisation selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, pour la prévention de l'ostéoporose chez la femme à tous les âges de la vie et en particulier en post-ménopause et chez la femme âgée.

14/ Utilisation selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, pour le traitement des états inflammatoires causés par la production excessive d'oxyde nitreux et/ou d'IgE, notamment de dermatites atopiques, arthrite rhumatoïde, ostéo-arthrite, les maladies neurodégénératives (sclérose en plaques, sclérose amyotrophique) et diabète.

15/ Utilisation selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, pour réduire les états fébriles associés aux maladies infectieuses, virales et parasitaires.

16/ Utilisation selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, pour le traitement des pathologies gynécologiques et endocriniennes telles que l'endométriose, les fibromes (léiomyomes), la pré-  
5 éclampsie et les avortements à répétition.

17/ Utilisation selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, pour la prévention et le traitement de la maladie d'Alzheimer.

18/ Utilisation selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, pour le traitement des dermatites, acné, lésions d'hyperkératose, eczéma, ainsi que le  
10 vieillissement de la peau et des rides.

19/ Utilisation des antagonistes selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 comme additifs  
15 alimentaires, en particulier pour compléter la nourriture des nouveaux nés, nourrissons et très jeunes enfants, dans un contexte d'exposition aux polluants arylhydrocarbures polycycliques et/ou halogénés.

20 20/ Utilisation des antagonistes selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, pour imprégner les filtres de cigarettes, afin de délivrer une dose d'antagoniste proportionnelle à la concentration de toxiques absorbée avec la fumée, et conduisant à une concentration sanguine permettant de bloquer l'induction  
25 de CYP1A1 et des autres enzymes de phase I au niveau des organes en contact avec les arylhydrocarbures.

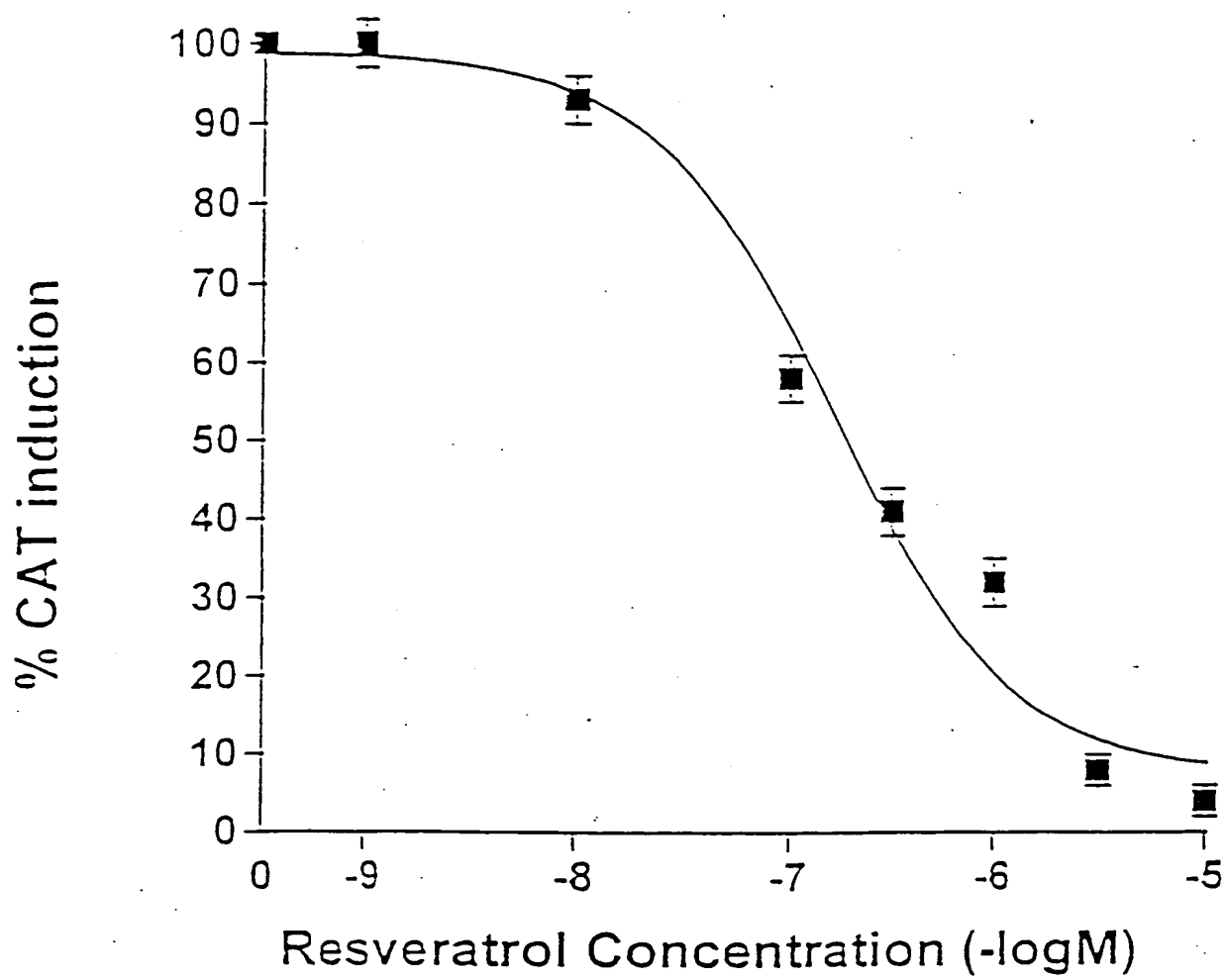


FIGURE 1B

1/8

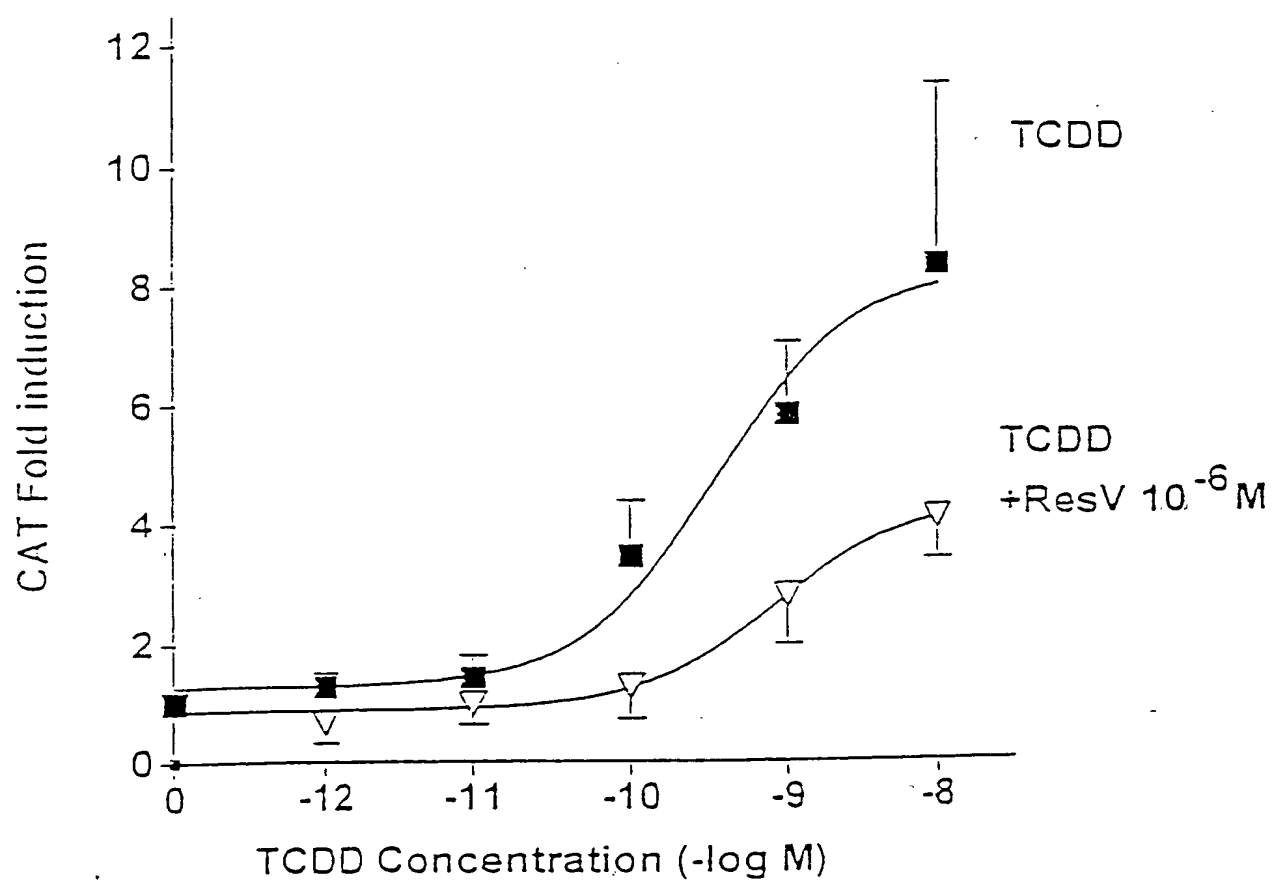


FIGURE 1A

3/8

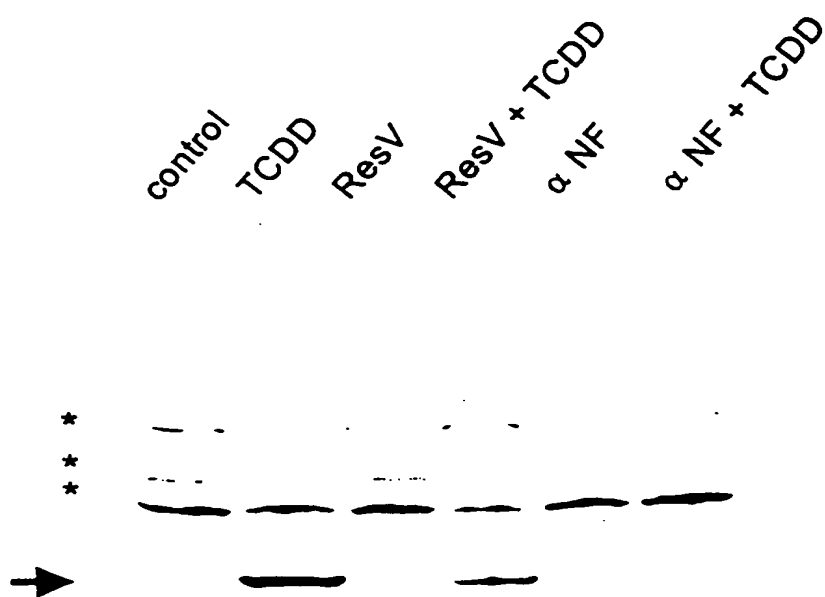


FIGURE 2

4/8

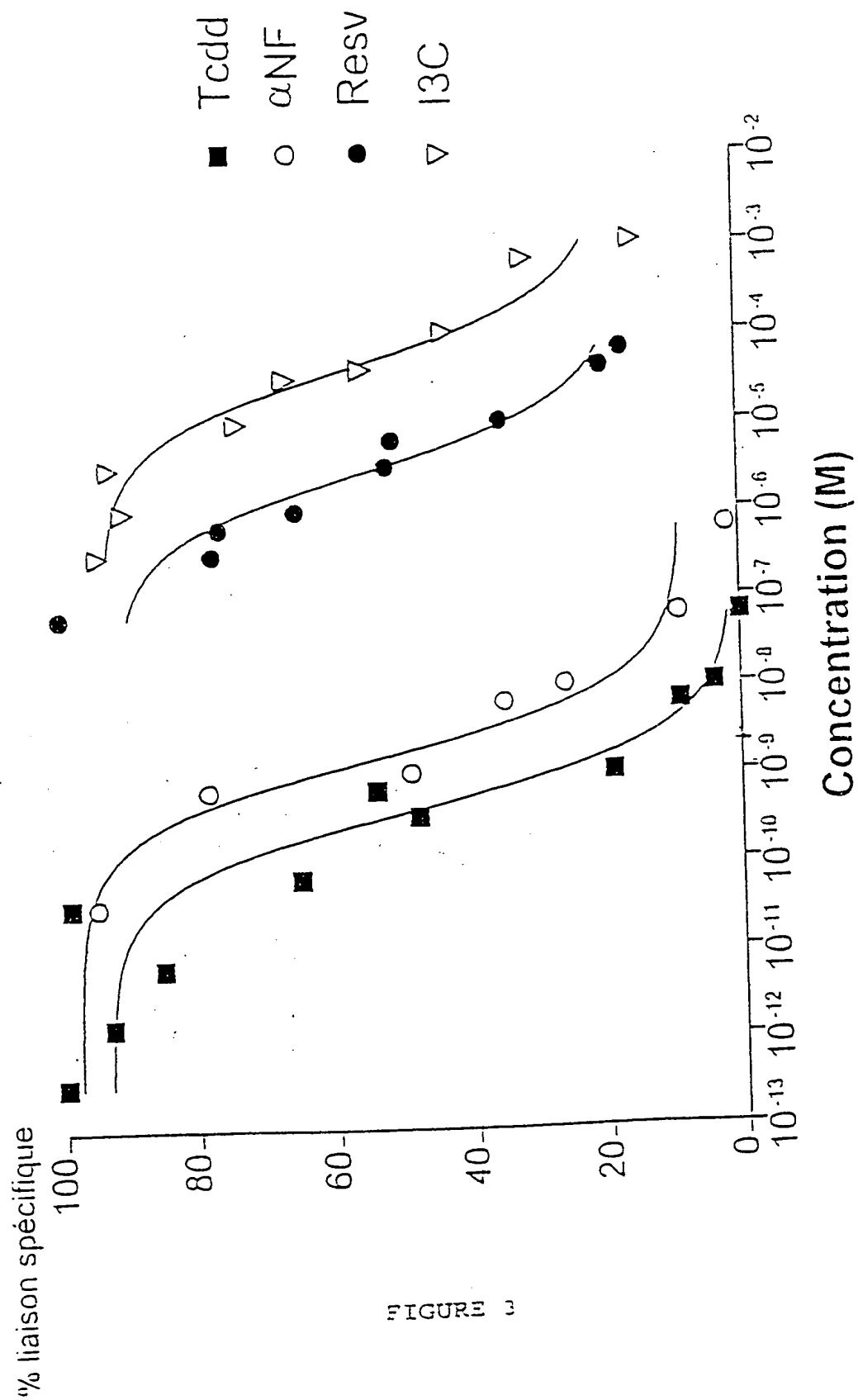


FIGURE 3

5/8

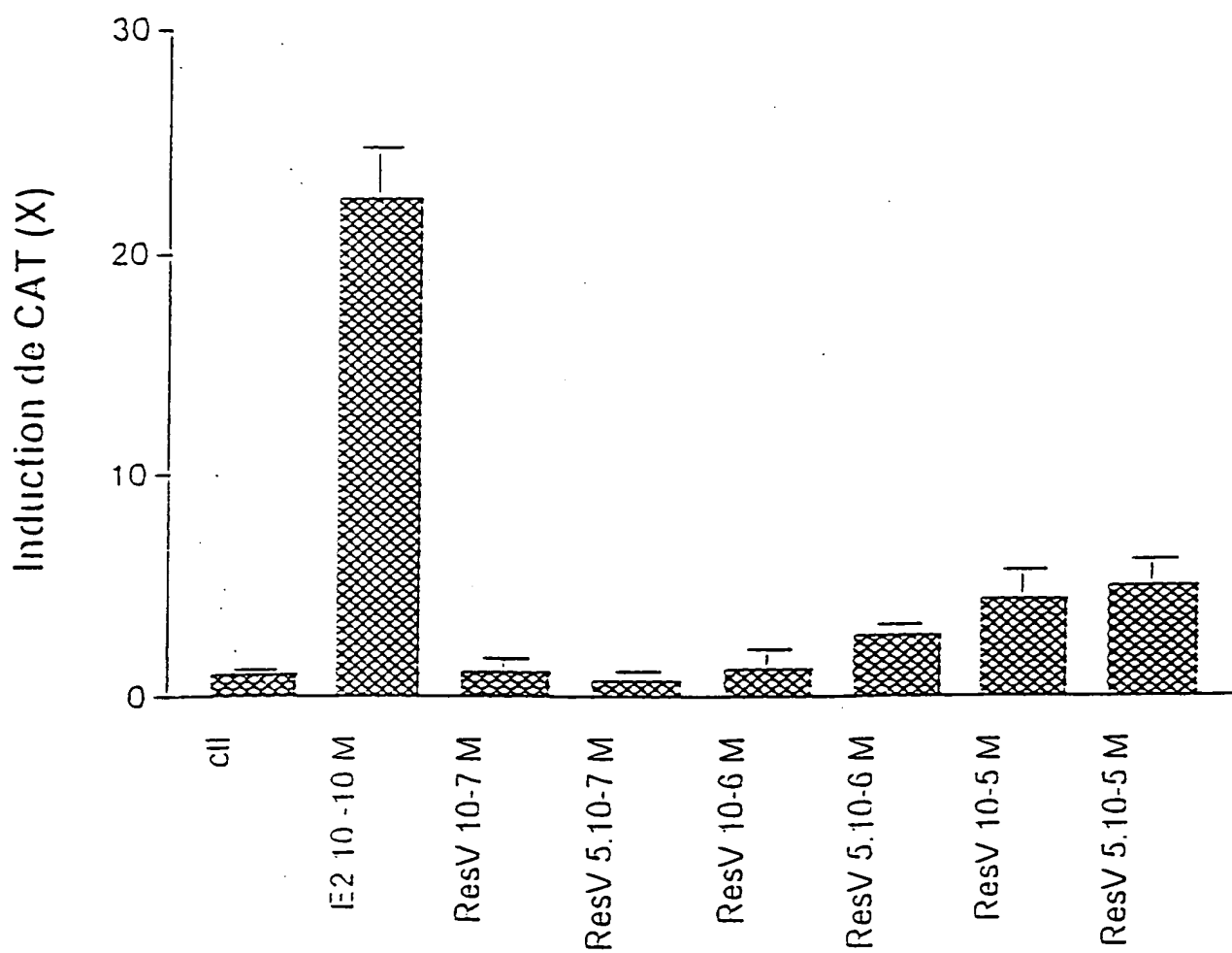


FIGURE 4

6/8

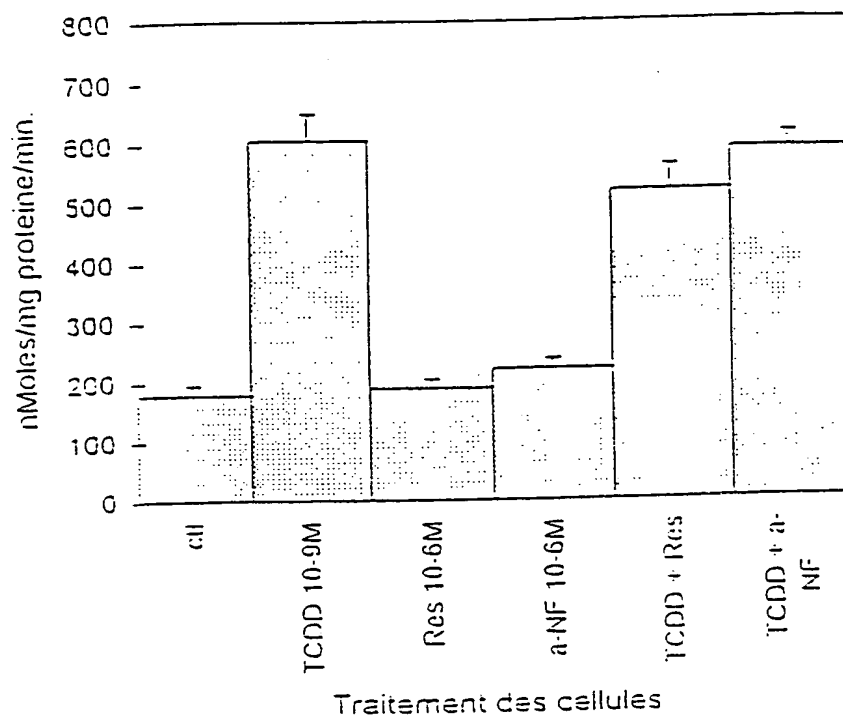


FIGURE 5

7/8

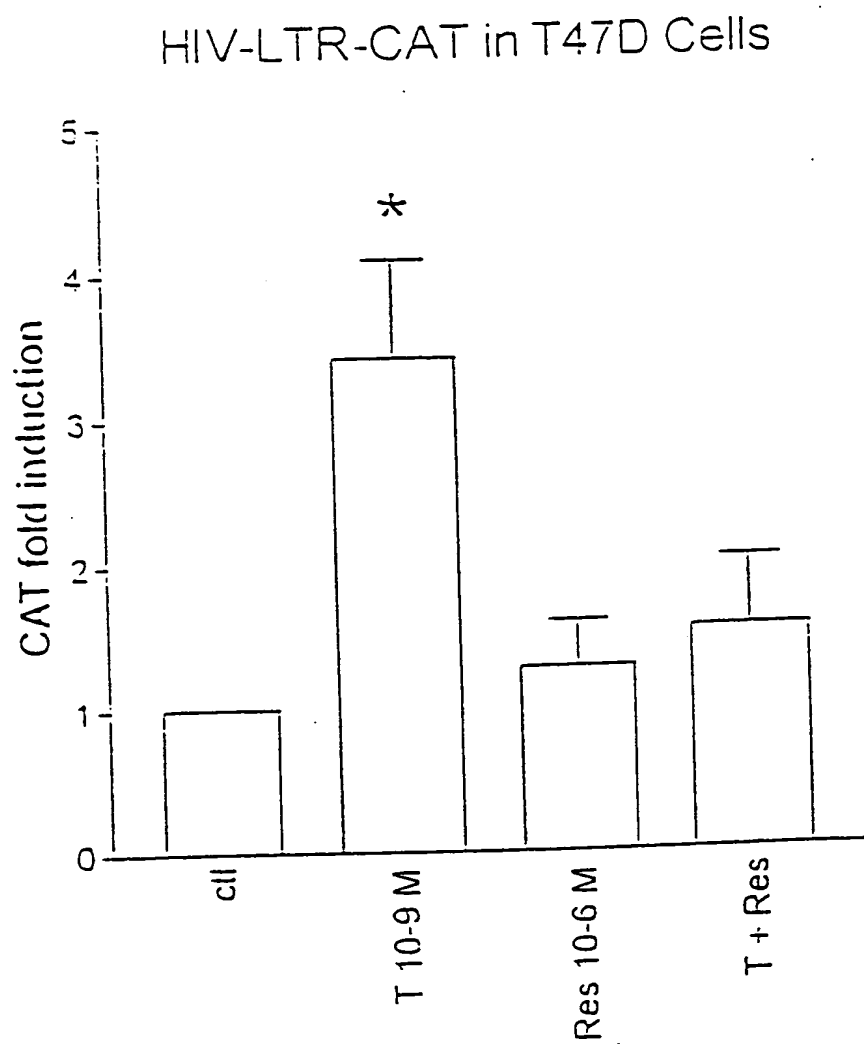


FIGURE 6

8/8

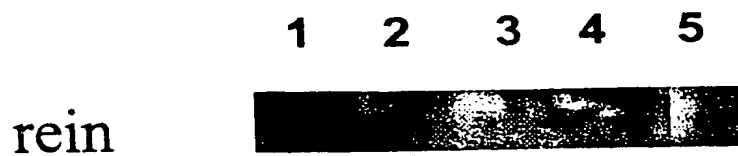


FIGURE 7

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 99/01063

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
 IPC 6 A61K31/05 A61K31/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	CIOLINO, HENRY P. ET AL: "Resveratrol inhibits transcription of CYP1A1 in vitro by preventing activation of the aryl hydrocarbon receptor" CANCER RES. (1998), 58(24), 5707-5712 CODEN: CNREA8; ISSN: 0008-5472, XP002090260 the whole document	1-20
P, X	WO 99 04747 A (UNILEVER PLC ; UNILEVER NV (NL)) 4 February 1999 (1999-02-04) the whole document	1, 2, 5-10, 18

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

## Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 September 1999

Date of mailing of the international search report

29/09/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hoff, P

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 99/01063

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JANG, MEISHIANG ET AL: "Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes" SCIENCE (WASHINGTON, D. C.) (1997), 275(5297), 218-220 CODEN: SCIEAS; ISSN: 0036-8075, XP002083956 the whole document ---	1,2, 5-10,19
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 9409 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B05, AN 94-071830 XP002090269 & JP 06 024967 A (YUSHIRO CO), 1 February 1994 (1994-02-01) abstract ---	1,2, 5-10,19
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 9517 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B05, AN 95-128236 XP002090270 & JP 07 053359 A (KAO CORP), 28 February 1995 (1995-02-28) abstract ---	1-11,14, 18,19
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 096, no. 011, 29 November 1996 (1996-11-29) & JP 08 175960 A (KAO CORP), 9 July 1996 (1996-07-09) abstract ---	1-10,18
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 9810 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 98-105073 XP002090271 & JP 09 328410 A (MITSUBA BOEKI KK), 22 December 1997 (1997-12-22) abstract ---	1,2, 6-10,18
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 9749 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 97-527396 XP002090272 & CN 1 127 070 A (HOU R), 24 July 1996 (1996-07-24) abstract ---	1,2, 6-10,13, 19
	---	
	-/--	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/01063

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 8637 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 86-242358 XP002090273 &amp; JP 61 171427 A (OSAKA YAKUHI KENKYUSHO KK), 2 August 1986 (1986-08-02) abstract</p> <p>---</p>	1-10, 19
X	<p>EP 0 773 020 A (SIGMA-TAU) 14 May 1997 (1997-05-14)</p> <p>the whole document</p> <p>---</p>	1, 2, 5-10, 14, 19
X	<p>G.Y. SUN ET AL.: "Protective role of polyphenols against neurodegeneration" JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY, vol. 70, no. s1, March 1998 (1998-03), page s59 XP002090261 the whole document</p> <p>---</p>	1, 2, 5-10, 14, 19
X	<p>DRACZYNSKA-LUSIAK, BOZENA ET AL: "Oxidized lipoproteins may play a role in neuronal cell death in Alzheimer disease" MOL. CHEM. NEUROPATHOL. (1998), 33(2), 139-148 CODEN: MCHNEM; ISSN: 1044-7393, XP002090262 abstract page 146, last paragraph -page 147</p> <p>---</p>	1, 2, 5-10, 14, 17, 19
X	<p>DRACZYNSKA-LUSIAK, B. ET AL: "Oxidized lipoproteins activate NF-<math>\kappa</math>B binding activity and apoptosis in PC12 cells" NEUROREPORT (1998), 9(3), 527-532 CODEN: NERPEZ; ISSN: 0959-4965, XP002090263 abstract page 531, right-hand column, last paragraph -page 532</p> <p>---</p>	1, 2, 5-10, 14, 15, 17, 19
X	<p>KIMURA, YOSHIYUKI ET AL: "Effects of stilbenes on arachidonate metabolism in leukocytes" BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA (1985), 834(2), 275-8 CODEN: BBACAQ; ISSN: 0006-3002, XP002090264 the whole document</p> <p>---</p>	1-10, 14, 19
X	<p>TSURUGA, TOMOKO ET AL: "Biologically active constituents of Melaleuca leucadendron: inhibitors of induced histamine release from rat mast cells" CHEM. PHARM. BULL. (1991), 39(12), 3276-8 CODEN: CPBTAL; ISSN: 0009-2363, XP002090265 the whole document</p> <p>---</p>	1-10, 14, 19
	<p>---</p> <p>-/--</p>	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/01063

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	I.O. GODFROID: "L'éloge du vin ?" PRESSE MEDICALE, vol. 26, no. 40, 1997, pages 1971-1974, XP002090266 the whole document ----	1,2, 5-10,13, 14,17,19
X	US 3 624 162 A (SIEBER ROLF) 30 November 1971 (1971-11-30) the whole document ----	1,4
A	GEHM, BARRY D. ET AL: "Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor" PROC. NATL. ACAD. SCI. U. S. A. (1997), 94(25), 14138-14143 CODEN: PNASA6;ISSN: 0027-8424, XP002090267 the whole document ----	1-20
A	MAZUMDER, ABHIJIT ET AL: "Effects of Tyrphostins, Protein Kinase Inhibitors, on Human Immunodeficiency Virus Type 1 Integrase" BIOCHEMISTRY (1995), 34(46), 15111-22 CODEN: BICHAW;ISSN: 0006-2960, XP002090268 Compound AG1233 abstract; tables 1,2 page 15118, right-hand column, last paragraph -page 15119, left-hand column, last paragraph -----	1-20

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 99/01063

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
  
see supplementary sheet INFORMATION FOLLOW-UP PCT/ISA/210
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## Continuation of Box I.2

Claims 1-5 concern a very wide variety of compounds. A support basis as defined in PCT Article 6 and/or a description as defined in PCT Article 5 can however be found for only a very limited number of the claimed compounds. In the present case, the claims are so lacking in support basis and the description of the invention so limited that it is impossible to carry out any significant search concerning the whole claimed spectrum. Consequently, the search was limited to the parts of the claims for which a support basis and a description are provided, that is those claims which concern compounds specifically mentioned in the application and in Claims 2-4.

Moreover, since the treatment of pathologies "caused by exposure to arylhydrocarbon ligands" does not constitute a clear definition of a disease, the search was exclusively based on the general concept of the invention as well as on the diseases mentioned in Claims 11 to 18.

Claims in respect of which the search was incomplete: 1-20.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims or parts of claims concerning inventions in respect of which no search report has been established need not be the subject of international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). The applicant is warned that the guideline normally adopted by the EPO acting in its capacity as International Examination Authority is not to proceed with a preliminary examination of a subject matter if no search has been carried out thereon. This position will remain unchanged, notwithstanding that the claims have been modified or not, either after receiving the search report, or during any procedure under Chapter II.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/01063

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9904747	A	04-02-1999	AU 8858498	A	16-02-1999
JP 6024967	A	01-02-1994	JP 2562092	B	11-12-1996
JP 7053359	A	28-02-1995	NONE		
JP 08175960	A	09-07-1996	NONE		
JP 9328410	A	22-12-1997	NONE		
CN 1127070	A	24-07-1996	NONE		
JP 61171427	A	02-08-1986	JP 1810047	C	27-12-1993
			JP 5016413	B	04-03-1993
EP 773020	A	14-05-1997	IT RM950687	A	17-04-1997
			CA 2187990	A	18-04-1997
			JP 9165331	A	24-06-1997
			US 5747536	A	05-05-1998
US 3624162	A	30-11-1971	BE 702721	A	16-02-1968
			CH 487096	A	15-03-1970
			DE 1593717	A	22-10-1970
			FR 1534311	A	
			GB 1167093	A	15-10-1969
			NL 6711158	A	19-02-1968

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Or nde internationale No

PCT/FR 99/01063

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 A61K31/05 A61K31/70

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
-----------	--	-------------------------------

P.X	<p>CIOLINO, HENRY P. ET AL: "Resveratrol inhibits transcription of CYP1A1 in vitro by preventing activation of the aryl hydrocarbon receptor" CANCER RES. (1998), 58(24), 5707-5712 CODEN: CNREA8; ISSN: 0008-5472, XP002090260 le document en entier</p>	1-20
-----	---	------

P.X	<p>WO 99 04747 A (UNILEVER PLC ; UNILEVER NV (NL)) 4 février 1999 (1999-02-04) le document en entier</p>	1, 2, 5-10, 18
-----	--	----------------

-/--

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

## \* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

21 septembre 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

29/09/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Hoff, P

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>JANG, MEISHIANG ET AL: "Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes" SCIENCE (WASHINGTON, D. C.) (1997), 275(5297), 218-220 CODEN: SCIEAS; ISSN: 0036-8075, XP002083956 le document en entier</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1,2, 5-10,19
X	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 9409 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B05, AN 94-071830 XP002090269 &amp; JP 06 024967 A (YUSHIRO CO), 1 février 1994 (1994-02-01) abrégé</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1,2, 5-10,19
X	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 9517 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B05, AN 95-128236 XP002090270 &amp; JP 07 053359 A (KAO CORP), 28 février 1995 (1995-02-28) abrégé</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-11,14, 18,19
X	<p>PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 096, no. 011, 29 novembre 1996 (1996-11-29) &amp; JP 08 175960 A (KAO CORP), 9 juillet 1996 (1996-07-09) abrégé</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-10,18
X	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 9810 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 98-105073 XP002090271 &amp; JP 09 328410 A (MITSUBA BOEKI KK), 22 décembre 1997 (1997-12-22) abrégé</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1,2, 6-10,18
X	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 9749 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 97-527396 XP002090272 &amp; CN 1 127 070 A (HOU R), 24 juillet 1996 (1996-07-24) abrégé</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1,2, 6-10,13, 19
	-/--	

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 8637 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 86-242358 XP002090273 & JP 61 171427 A (OSAKA YAKUHIIN KENKYUSHO KK), 2 août 1986 (1986-08-02) abrégé	1-10, 19
X	EP 0 773 020 A (SIGMA-TAU) 14 mai 1997 (1997-05-14)  le document en entier	1, 2, 5-10, 14, 19
X	G.Y. SUN ET AL.: "Protective role of polyphenols against neurodegeneration" JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY, vol. 70, no. s1, mars 1998 (1998-03), page s59 XP002090261 le document en entier	1, 2, 5-10, 14, 19
X	DRACZYNSKA-LUSIAK, BOZENA ET AL: "Oxidized lipoproteins may play a role in neuronal cell death in Alzheimer disease" MOL. CHEM. NEUROPATHOL. (1998), 33(2), 139-148 CODEN: MCHNEM; ISSN: 1044-7393, XP002090262 abrégé page 146, dernier alinéa -page 147	1, 2, 5-10, 14, 17, 19
X	DRACZYNSKA-LUSIAK, B. ET AL: "Oxidized lipoproteins activate NF- $\kappa$ B binding activity and apoptosis in PC12 cells" NEUROREPORT (1998), 9(3), 527-532 CODEN: NERPEZ; ISSN: 0959-4965, XP002090263 abrégé page 531, colonne de droite, dernier alinéa -page 532	1, 2, 5-10, 14, 15, 17, 19
X	KIMURA, YOSHIYUKI ET AL: "Effects of stilbenes on arachidonate metabolism in leukocytes" BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA (1985), 834(2), 275-8 CODEN: BBACAO; ISSN: 0006-3002, XP002090264 le document en entier	1-10, 14, 19
X	TSURUGA, TOMOKO ET AL: "Biologically active constituents of Melaleuca leucadendron: inhibitors of induced histamine release from rat mast cells" CHEM. PHARM. BULL. (1991), 39(12), 3276-8 CODEN: CPBTAL; ISSN: 0009-2363, XP002090265 le document en entier	1-10, 14, 19

-/--

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	I.O. GODFROID: "L'éloge du vin ?" PRESSE MEDICALE, vol. 26, no. 40, 1997, pages 1971-1974, XP002090266 le document en entier ---	1,2, 5-10,13, 14,17,19
X	US 3 624 162 A (SIEBER ROLF) 30 novembre 1971 (1971-11-30) le document en entier ---	1,4
A	GEHM, BARRY D. ET AL: "Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor" PROC. NATL. ACAD. SCI. U. S. A. (1997), 94(25), 14138-14143 CODEN: PNASA6;ISSN: 0027-8424, XP002090267 le document en entier ---	1-20
A	MAZUMDER, ABHIJIT ET AL: "Effects of Tyrophostins, Protein Kinase Inhibitors, on Human Immunodeficiency Virus Type 1 Integrase" BIOCHEMISTRY (1995), 34(46), 15111-22 CODEN: BICHAW;ISSN: 0006-2960, XP002090268 * composé AG1233 abrégé; tableaux 1,2 page 15118, colonne de droite, dernier alinéa -page 15119, colonne de gauche, dernier alinéa -----	1-20

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

emande internationale n°

PCT/FR 99/01063

## Cadre I Observations – lorsqu'il a été estimé qu certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2(a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n<sup>os</sup> — se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☒ Les revendications n<sup>os</sup> — se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:  
Voir feuille supplémentaire SUITE DES RENSEIGNEMENTS PCT/ISA/210
3. ☐ Les revendications n<sup>os</sup> sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

## Cadre II Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n<sup>os</sup> —
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications: elle est couverte par les revendications n<sup>os</sup> —

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

## SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

## Suite du cadre I.2

Les revendications 1-5 présentes ont trait à une très grande variété de composés. Un fondement au sens de L'Article 6 PCT et/ou un exposé au sens de l'Article 5 PCT ne peut cependant être trouvé que pour un nombre très restreint de ces composés revendiqués. Dans le cas présent, les revendications manquent à un tel point de fondement et l'exposé de l'invention dans la description est si limité qu'une recherche significative couvrant tout le spectre revendiqué est impossible. Par conséquent, la recherche a été limitée aux parties des revendications qui présentent un fondement et un exposé, c'est à dire les parties ayant trait aux composés spécifiquement mentionnés dans la demande et dans les revendications 2 à 4.

De plus, le traitement d'affections "provoquées par l'exposition à des ligands arylhydrocarbures" n'étant pas une définition claire d'une maladie, la recherche a porté exclusivement sur l'idée générale de l'invention ainsi que sur les maladies mentionnées dans les revendications 11 à 18.

Revendications ayant fait l'objet d'une recherche incomplète: 1-20

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications, ou des parties de revendications, ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II.

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dr. n° Internationale No

PCT/FR 99/01063

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9904747 A	04-02-1999	AU 8858498 A	16-02-1999
JP 6024967 A	01-02-1994	JP 2562092 B	11-12-1996
JP 7053359 A	28-02-1995	AUCUN	
JP 08175960 A	09-07-1996	AUCUN	
JP 9328410 A	22-12-1997	AUCUN	
CN 1127070 A	24-07-1996	AUCUN	
JP 61171427 A	02-08-1986	JP 1810047 C JP 5016413 B	27-12-1993 04-03-1993
EP 773020 A	14-05-1997	IT RM950687 A CA 2187990 A JP 9165331 A US 5747536 A	17-04-1997 18-04-1997 24-06-1997 05-05-1998
US 3624162 A	30-11-1971	BE 702721 A CH 487096 A DE 1593717 A FR 1534311 A GB 1167093 A NL 6711158 A	16-02-1968 15-03-1970 22-10-1970 15-10-1969 19-02-1968